

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公告

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-18835

⑬ Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成4年(1992)3月27日

C 12 N 1/14  
 15/01  
 C 12 P 19/10  
 //(C 12 N 1/14  
 C 12 R 1:645)  
 (C 12 N 15/01  
 C 12 R 1:645)  
 (C 12 P 19/10  
 C 12 R 1:645)

A 9050-4B

8214-4B

8717-4B C 12 N 15/00

E

発明の数 2 (全3頁)

⑮ 発明の名称 オーレオバシジウム・ブルランス菌株及びその製造方法

⑯ 特 願 昭61-258693

⑰ 公 開 昭62-111681

⑱ 出 願 昭61(1986)10月31日

⑲ 昭62(1987)5月22日

優先権主張 ⑳ 1985年11月5日㉑ 西ドイツ(DE)㉒ P3539180.4

⑳ 発 明 者 アウグスト・ベツケ ドイツ連邦共和国 ゲルテンドルフ、リンデン・シュトラ  
 ーセ 10

㉑ 発 明 者 コンラート・レヒネル ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 82、ツルネル シュトラ  
 ーセ 33

㉒ 発 明 者 オットー・フーベル ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 70、ブライトブルンネ  
 ル・シュトラーセ 17

㉓ 出 願 人 コンソルティウム・フ ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 70、ツイールシュタッ  
 ユア・エレクトロケミ ト シュトラーセ 20  
 ツシエ・インドウスト  
 リー・ゲゼルシャフ  
 ト・ミット・ベシユレ  
 ンクテル・ハフツング

㉔ 代 理 人 弁理士 佐々木 清隆 外3名

審 査 官 佐 伯 裕 子

微生物の受託番号 DSM 3562

1

2

## ㉕ 特許請求の範囲

1 ブランを産生し、かつ下記の工程、すなわ  
 ち、

(a) ブランおよびメラニンを生産するオーレオ  
 バシジウム・ブルランス菌株をそれ自体公知の 5  
 方法で突然変異生成条件下に処理し、

(b) 次に、こうして突然変異条件下に処理した菌  
 株を、それ自体公知の方法で培養し、そして、

(c) 突然変異オーレオバシジウム・ブルランス菌  
 株(1個またはそれ以上のコロニーの形で)を 10  
 選択する、

ことによつて得ることのできるオーレオバシジウ  
 ム・ブルランスであつて、その選択された菌株が  
 メラニンを産生せず、ブルランの生成量が親株の  
 それよりも50%以上高い前記オーレオバシジウ  
 ム・ブルランス菌株。

2 UV光線での照明あるいは化学的処理、特に  
 メタンスルホン酸エチルでの処理による突然変異  
 によつて得られる特許請求の範囲第1項に記載の  
 菌株。

3 前記(b)工程において、細胞増殖がほとんどな  
 いかあるいは全てないが、しかし尚メラニンの生

成が行なわれる温度範囲、特に2~13℃の温度範囲、好ましくは4~10℃の温度範囲で培養を行うことにより得られる特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の菌株。

4 出発菌株としてATCC9348を使用することによつて得られる特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の菌株。

5 オーレオバシジウム・ブルランス菌株がブルランを産生するオーレオバシジウム・ブルランス菌株P56である特許請求の範囲第1項に記載の菌株。

6 下記の工程、すなわち、

(a) ブルランおよびメラニンを生産するオーレオバシジウム・ブルランス菌株をそれ自体公知の方法で突然変異生成条件下に処理し、

(b) 次に、こうして突然変異条件下に処理した菌株を、それ自体公知の方法で培養し、そして、

(c) 突然変異オーレオバシジウム・ブルランス菌株(1個またはそれ以上のコロニーの形で)を選択することから成る、ブルランを生産し、メラニンを産生せず、ブルランの生成量が親株のそれよりも50%以上高いオーレオバシジウム・ブルランス菌株の製造方法。

7 UV光線での照明あるいは化学的処理、特にメタンスルホン酸エチルでの処理によ突然変異を行う特許請求の範囲第6項に記載のオーレオバシジウム・ブルランス菌株の製造方法。

8 前記(b)工程において、細胞増殖がほとんどないかあるいは全てないが、しかし尚メラニンの生成が行なわれる温度範囲、特に2~13℃の温度範囲、好ましくは4~10℃の温度範囲で培養を行う特許請求の範囲第6項に記載のオーレオバシジウム・ブルランス菌株の製造方法。

9 出発菌株としてATCC9348を使用する特許請求の範囲第6項に記載のオーレオバシジウム・ブルランス菌株の製造方法。

#### 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ブルランを生産し実質的にメラニンを産生しないオーレオバシジウム・ブルランス(*Aureobasidium pullulans*) 菌株およびその製造方法ならびにその用途に関する。

(従来技術とその問題点)

オーレオバシジウム属の菌株がブルランを生産

することは知られている。ブルランはマルトリ・オース単位( $\alpha$ -1-4結合)を有し、該単位が $\alpha$ -1-6位結合している多糖類である。(Bernier著、「Can.J.Microbiol.」, 4(1958) p.195-204) および Bender、Lehmann および Wallenfels 著「Biochim. Biophys. Acta」, 36(1959)、p. 309-316」参照。)

この多糖類ブルランは例えば下記の様な種々の用途を有している。

10 (1) 二酸化炭素透過性であつて酸素非透過性の透明フィルム製造の用途。

(2) 凝集剤としての用途。

(3) 渡度出液におけるデキストラン代替物としての用途。

15 オーレオバシジウム属の菌株は培養中に帯緑黒色の着色物(メラニン)を生成する。このメラニンは通常のブルラン抽出においては除去することができない。従つて本発明の目的の1つは、従来技術によるよりもメラニンの生成量のより少ないオーレオバシジウム・ブルランス菌株を提供することにある。本発明の他の目的は、この種の菌株の製造方法ならびに該菌株を用いてブルランを生産するという該菌株の用途を提供することにある。

25 (問題点を解決するための手段)

従つて本発明は、ブルランを生産し、かつメラニンの生産量が低下したものであつて、そして下記の工程、すなわち、

30 (a) ブルランおよびメラニンを産生するA.ブルランス菌株をそれぞれ自体公知の方法で突然変異生成条件下に処理し、

(b) 次に、こうして突然変異条件下に処理した菌株を、それ自体公知の方法で培養し、そして、

35 (c) 突然変異A.ブルランス菌株(1個またはそれ以上のコロニーの形で)を選択する、

ことによつて得ることのできるA.ブルランス菌株に関するものであり、このような選択された菌株はメラニンを産生せず、ブルランの生成量は親株のそれよりも50%以上高い。

40 この突然変異菌株は、例えば、寒天平板培養培地上で培養することができる。選択されたコロニーは、これらが尚充分量のブルランを生産するか否かを確信するために、液体培地中で試験することができる。

5

本発明のA.ブルランス菌株はUV光線照射によるかあるいは化学的処理特にメタンスルホン酸エチルでの処理によって突然変異させて得ることができる。

メラニンの生成は時々起る。培養中にメラニンを生成させ、あるいはメラニンを生成させないためには、個々のコロニーをこの段階中に一緒に成長させることなくそして細胞層を形成しないようにすることが好ましい。このためには、前記(b)工程において細胞増殖がほとんど起らないかあるいは全く起らないで尚メラニンが生成する温度範囲、特に2~13°C、好ましくは4~10°Cの温度範囲で培養することができる。

親株としてATCC 9348を使用することができる。

この公知菌株からの突然変異産物の1つはA.ブルランス株P56であり、これは独国微生物委託機関に委託しており、その委託番号は、DSM3562である。この株P56の菌学的性質は、新株ATCC9348とは、前者が本発明の菌株はメラニンを生成しなくかつブルランの生成量が後者の新株よりも50%以上も多い点において相異している。

本発明のA.ブルランス菌株は、前記の工程(a)~(c)により、そして適当な場合には前記した特定の条件下に得ることができる。

ブルランは本発明のA.ブルランス菌株を培地中で培養することにより、即ちブルランを培地中に生成させ、そして生成したブルランを該培地から単離することにより得ることができる。培地は菌株が利用可能な炭素源(例えば、グルコース、シユークロス、マルトース又はキシロース)ならびに酵母エキスおよび細胞成長に必須の無機塩類を含有している必要がある。通常、培養は好気条件下で、例えば20~30°Cの温度で、そして例えば2.5~6のpHで震盪培養によるかあるいは通気しながら行う液内培養によって行なわれる。

本発明を下記の実施例により詳しく説明する。

#### 実施例 1

市販のA.ブルランス菌株(例えばATCC9348)を、5g/ℓのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1g/ℓのNaCl、0.6g/ℓの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2g/ℓのMgSO<sub>4</sub>、0.4g/ℓの酵母エキスおよび30g/ℓのシユークロ

6

ースを含有し、そしてHClでpHを5.5に調整したドウイ(Le Duy)の培地中で培養する。

その菌株を該培地中で24時間培養する。次に菌糸体を6000×gで5分間遠心分離して除去する。上澄液を17000×gで10分間再遠心分離する。この遠心分離の結果生成したペレット(小球状の菌糸塊)を生理食塩水で洗い、次に細胞密度を1×10<sup>7</sup>個/mlに調節する。次にこの懸濁液にUV光線(354nm; 1400μW/cm<sup>2</sup>)を7~8分間照射する。

この懸濁液(0.1ml)を寒天培養板(300gのポテトエキスと20gのグリコースと15gの寒天/ℓ)上に2~3日間載置する。この培養板を8日間4°Cに保つ。こうした御、無着色であるか、あるいは実質的に無着色であるコロニーを選択する。この選択されたコロニーにつき、これらが尚充分な量のブルランを生成するか否かを検査する。

#### 実施例 2

次の成分から培養培地を生成する。1ℓの蒸留水、5gのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1gのNaCl、0.6gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2gのMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.4gの酵母エキスおよび30gの炭素源(前記参照)。

この培地100mlをHClでpH5.5に調節する。

次にこの培地を500mlの三角フラスコに入れて滅菌する。次に、前記実施例1で作成した本発明の菌株P56をこの培地に接種する。培養を26°Cで攪拌下(200rpm)に行う。

7日間培養後、培地を27,000×gで15分間遠心分離する。2倍量の96%エタノールを上澄液に加えて混合し、混合物を1000×gで10分間遠心分離するとその間に白色のブルランが分離してくる。生成物を洗浄し、粉碎し、水に再溶解し、エタノールで再沈澱させそして次に乾燥する。

この生成物の同質のために、これを<sup>13</sup>CNMR分析と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかける。

#### 比較例 1

実施例2と同様の操作を、但し市販のA.ブルランス菌株(例えばATCC 9348)を使用して、繰り返す。生成したブルランは強い帯緑黒色に着色していた。